

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Aneta Brunová

Úloha RhoA/Rho kinázové signální dráhy v regulaci krevního tlaku
u normotenzních a hypertenzních potkanů

The role of RhoA/Rho kinase signaling pathway in the regulation of blood pressure in
normotensive and in hypertensive rats

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Josef Zicha, DrSc.

Praha, 2013

Poděkování

Děkuji svému školiteli MUDr. Josefu Zichovi, DrSc. za pedagogické vedení, cenné rady i inspiraci.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu

V Praze dne 17. 5. 2013

.....

Obsah

1	Úvod	7
2	Základní regulační mechanizmy krevního tlaku a periferní rezistence	9
2.1	Fyzikální zákonitosti.....	9
2.2	Nervová regulace.....	9
2.3	Humorální regulace	10
2.4	Účinek stimulace α -adrenergních receptorů na buňky hladkého svalstva cév.....	12
3	Iontové kanály a jejich zapojení v regulaci kontrakce cév	13
3.1	Napětově řízené vápníkové kanály typu L (L-VDCC).....	13
3.2	Draslíkové kanály	14
3.3	Kanály TRP (transient receptor potential)	15
3.3.1	TRPC (canonical).....	15
3.3.2	TRPM (melastatin).....	16
4	RhoA/Rho kinázová signální dráha	17
4.1	RhoA.....	17
4.2	Rho-kináza	18
4.2.1	Struktura ROCK.....	18
4.2.2	Regulace aktivity ROCK.....	19
4.2.3	Substráty ROCK.....	19
4.2.4	Inhibitory ROCK	20
5	Úloha RhoA/Rho kinázové dráhy v regulaci krevního tlaku SHR	21
5.1	Účinky inhibice Rho-kinázy na periferní rezistenci.....	21
5.2	Působení Rho-kinázy na úrovni organismu	23
6	Závěr.....	24

Seznam zkratek

Akt	proteinkináza B	MLC₂₀	lehký řetězec myosinu
2-P	„two pore“ draslíkový kanál	MLCK	kináza lehkého řetězce myosinu
AMK	aminokyselina	MLCP	fosfatáza lehkého řetězce myosinu
AngII	angiotensin II	MYPT1	<i>myosin-phosphatase targeting subunit</i>
AT₁	typ 1 receptoru angiotensinu II	NE	noradrenalin (norepinefrin)
AV3V	anteroventrální oblasti hypothalamu	NGF	nervový růstový faktor
CaM	kalmodulin	NO	oxid dusnatý
CANs	neselektivní kationtové kanály aktivované vápníkem	NTS	<i>nucleus tractus solitarii</i>
CPI-17	<i>Protein kinase C (PKC)-potentiated myosin phosphatase inhibitor cysteine-rich domain</i>	PH	<i>Pleckstrin homology domain</i>
CRD		PKA	proteinkináza A
CVLM	kaudální ventrolaterální prodloužená mícha	PKC	proteinkináza C
DAG	diacylglycerol	PKG	proteinkináza G
EDH	<i>endothelium-dependent hyperpolarisation</i>	PLC-β	fosfolipáza C - β
eNOS	endoteliální NO syntáza	PRK	<i>Rho-dependent PKC-related kinase</i>
ET-1	endotelin I	PTX	pertusis toxin
GAPs	<i>GTPase activating proteins</i>	PVH	paraventrikulární jádro hypothalamu
GDI	<i>GDP dissociation inhibitors</i>	RBD	<i>Rho-binding domain</i>
GEFs	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>	RhoGDI	<i>GDP dissociation inhibitors for Rho</i>
ILK	<i>integrin-like kinases</i>	RhoGEF	<i>guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPase</i>
IP₃	inositoltrisfosfát	ROCK	Rho-kináza
K_{Ca}	vápníkem ovládaný draslíkový kanál o velké vodivosti (též BK _{Ca})	ROCK-1	izoforma I Rho-kinázy
K_{ir}	„inward rectifier“ draslíkový kanál	ROCK-2	izoforma II Rho-kinázy
KT	krevní tlak	RVLM	rostrální ventrolaterální prodloužená mícha
K_v	napětově ovládaný draslíkový kanál	SHR	spontánně hypertenzní potkani
L-VDCC	napětově řízené vápníkové kanály typu L	SK_{Ca}	draslíkový kanál o malé vodivosti aktivovaný vápníkem
		SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
		SR	sarkoplazmatické retikulum
		TEA	tetraethylamonium

TRP *transient receptor potential channel*
TRPA ankyrinový TRP
TRPC kanonický TRP
TRPM melastatinový TRP
TRPML mucolipinový TRP
TRPP polycystinový TRP

TRPV vaniloidní TRP
VSMC buňky hladké svaloviny cév
WKY Wistar-Kyoto potkani
ZIPK *zipper-interacting proteinkinase*
 ΔV_m změna membránového napětí

Abstrakt

Přibývá důkazů o významné roli Rho-kinázy v cévních onemocněních. Rho-kináza je klíčovým enzymem vápníkové senzitzace v buňkách hladké svaloviny cév. Vápníková senzitzace je charakterizována jako zvýšená kontraktilní odpověď buňky při konstantní intracelulární koncentraci vápníkových iontů. Inhibitory Rho-kinázy vykazují celou řadu pozitivních účinků na kardiovaskulární systém, zejména snižují periferní rezistenci. V této práci jsou shrnuty pokroky v poznání signálních drah účastnících se regulace periferní rezistence u spontánně hypertenzních potkanů (SHR). Je zřejmé, že zvýšená sympatická aktivita a změněná regulace iontových kanálů buněk hladké svaloviny cév společně přispívají k abnormálně zvýšenému krevnímu tlaku SHR.

Klíčová slova: Rho-kináza, hypertenze, periferní rezistence, SHR, vápníková senzitzace

Abstract

Evidence is accumulating that point to a major role of Rho kinase in arterial pathophysiology. Rho kinase is a key enzyme in calcium sensitization in vascular smooth muscle cells. Calcium sensitization is characterized as an increase in vascular contractility in the conditions of constant cytosolic calcium level. Inhibitors of Rho-kinase exert beneficial effects on the cardiovascular system, mainly by lowering vascular contractility. This thesis summarizes the current progress in understanding of the signaling pathways involved in the control of peripheral resistance of spontaneously hypertensive rats (SHR). It is evident that enhanced sympathetic activity and abnormal regulation of ion channel activity collectively contribute to high blood pressure maintenance in SHR.

Keywords: Rho-kinase, hypertension, peripheral resistance, SHR, calcium sensitization

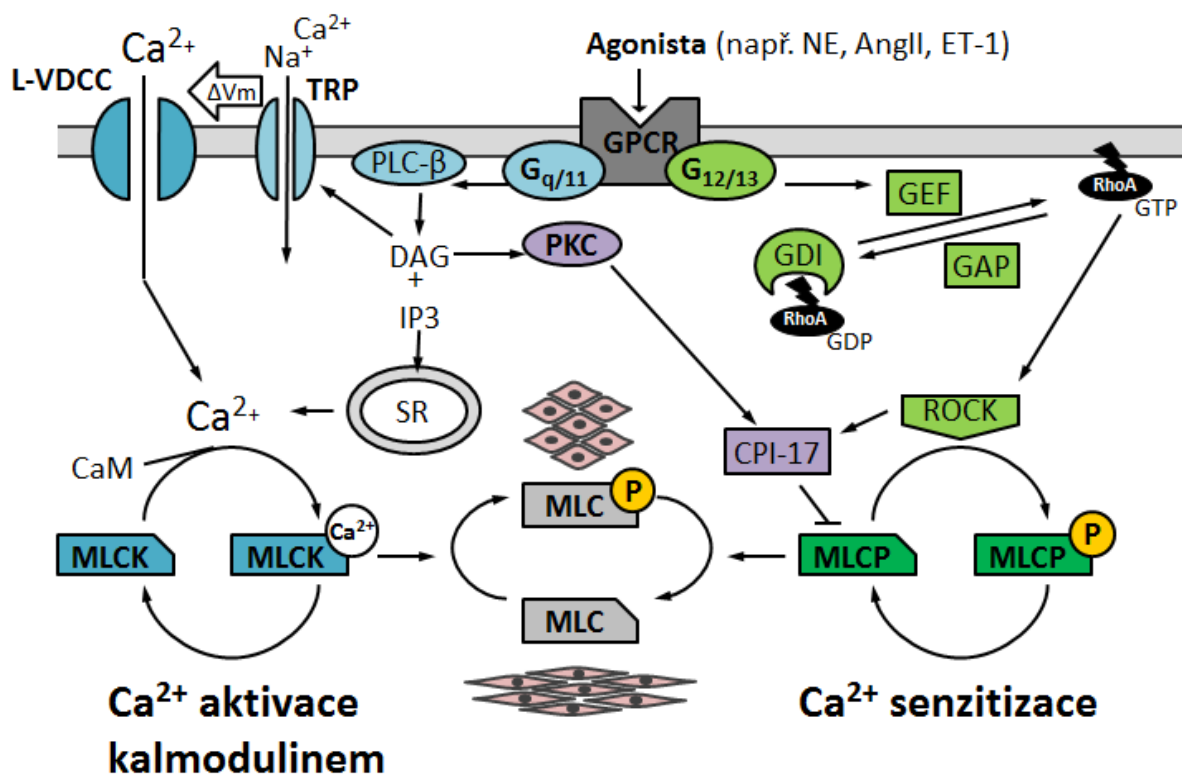
1 Úvod

Vysoký krevní tlak je významným rizikovým faktorem civilizačních chorob. U 95 % všech nemocných jde o esenciální hypertenzi, která vzniká společným působením genetických predispozic a faktorů prostředí (Špinar et al., 1999, Launay et al., 2004). Vědecký výzkum v posledních desetiletích umožnil hlubší porozumění mechanismům rozvoje esenciální hypertenze a vývoj účinných léčiv.

Krevní tlak je funkcí srdečního výdeje a periferního odporu (Guyenet, 2006). Řízení odporu cévního řečiště umožňuje schopnost cév kontrahovat se v odpovědi na příchozí signály. Stah hladkého svalu je řízen především intracelulární hladinou vápníku, přičemž za zdroj iontů slouží vnitřní i vnější prostředí buňky (Somlyo a Somlyo, 1994). Při zvýšené intracelulární koncentraci se vápník váže na kalmodulin a způsobuje tak konformační změnu, která umožňuje navázání tohoto komplexu na kinázu lehkého řetězce myosinu (MLCK). Kináza je touto interakcí aktivována a katalyzuje fosforylaci serinu 19 lehkého řetězce myosinu (MLC₂₀). Fosforylace způsobuje pohyb hlavy myosinu, která se díky tomu ocitá v kontaktu s aktinem (první konformační změna myosinu). Fosforylace zároveň stimuluje adenosintrifosfátázovou aktivitu. Adenosintrifosfát se štěpí za uvolnění energie, která je využita k vzájemnému posunu aktinových a myosinových filament (druhá konformační změna myosinu) (Somlyo a Somlyo, 1994, Itoh et al., 1989). Zvýšená fosforylace serinu 19 nemusí být pouze důsledkem aktivace MLCK, ale také důsledkem sníženého odbourávání fosforylovaného myosinu při inhibici fosfatázy lehkého řetězce myosinu (MLCP) (Kitazawa et al., 1991). Zvýšení kontraktility při shodné hladině intracelulárního vápníku je nazýváno vápníková senzitivace. Kontrakce hladké svaloviny cév je tedy obecně vyvolána buď aktivací kinázy lehkého řetězce myosinu (pomocí kalmodulinu) či vápníkovou senzitivací (viz obr. 1). Rho-kináza (ROCK) je klíčovým enzymem vápníkové senzitivace (Uehata et al., 1997).

Jednotlivé komponenty Rho-kinázové signální dráhy byly již do značné míry popsány. V experimentálních podmínkách nejčastěji pozorujeme kontrakci vyvolanou agonisty membránových receptorů spojených s G proteiny. Vazoaktivní látky působí na G_{12/13} proteiny, které aktivují RhoGEF (guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPase), způsobující na regulačním enzymu RhoA výměnu GDP za GTP (Suzuki et al., 2009). Následně se RhoA přesouvá do plazmatické membrány, kde aktivuje Rho-kinázu (Leung et al., 1995, Amano et al. 1996, Ishizaki et al., 1996). Rho-kináza fosforyluje, a tím deaktivuje fosfatázu lehkého řetězce myosinu (MLCP) (Kimura et al., 1996). Senzitivace vede k akumulaci fosforylovaného myosinu při konstantní intracelulární koncentraci vápníku.

Má práce pojednává zejména o experimentech prováděných na spontánně hypertenzních (SHR) potkanech. SHR potkani jsou inbrední kmen, u něhož hypertenze vzniká bez vnějších podnětů, které by vysoký krevní tlak přímo stimulovaly. Jejich normotenzní kontrolou jsou Wistar-Kyoto (WKY) potkani. U dospělých SHR se střední tlak pohybuje přibližně v rozmezí 160-180 mm Hg v porovnání s 110-120 mm Hg u normotenzních potkanů (Judy et al., 1976).



Obrázek 1: Ca^{2+} aktivace kalmodulinem a Ca^{2+} senzitivace. Kontraktilní stav buněk hladké svaloviny cév je dán dynamickou rovnováhou mezi fosforylací a defosforylací lehkého řetězce myosinu (MLC). Po vstupu do buňky se vápník váže na kalmodulin (CaM) a aktivuje kinázu lehkého řetězce myosinu (MLCK), což představuje vápníkovou aktivaci kalmodulinem. Druhým mechanismem zvyšujícím kontraktilitu je Ca^{2+} senzitivace, zprostředkovaná působením Rho-kinázy (ROCK) na fosfatázu lehkého řetězce myosinu (MLCP). Veškeré zkratky jsou uvedeny v seznamu zkratk (Behuliak, M. 2012 nepublikované sdělení).

Krevní tlak (TK) novorozeneých SHR bývá vyšší než u WKY, avšak největší rozdíl mezi oběma kmeny vzniká později – zejména mezi třetím a desátým týdnem po narození, kdy růst krevního tlaku akceleruje (Gray, 1984, Lais et al., 1977). Tlak SHR roste rychleji, takže na konci tohoto období je zhruba o 30 % vyšší než u WKY. Důsledkem jsou mimo jiné strukturní změny cév, zejména hypertrofie. Ve věku deseti týdnů se růst krevního tlaku u WKY zastaví, zatímco u SHR pokračuje zhruba až do dvaceti týdnů po porodu (Zicha a Kuneš, 1999).

Při zkoumání poruch, ke kterým u hypertenze dochází, se používají také potkani s různými druhy indukované hypertenze (hypertenze vyvolaná příjmem soli, NO-deficientní potkani atd.). Teprve propojením poznatků o jednotlivých experimentálních modelech získáváme celistvý obraz fyziologie kardiovaskulárního systému.

Cílem mé práce je popsat základní regulační mechanismy krevního tlaku, úlohu iontových kanálů v regulaci kontrakce a podíl RhoA/Rho kinázové signální dráhy na regulaci krevního tlaku.

2 Základní regulační mechanismy krevního tlaku a periferní rezistence

2.1 Fyzikální zákonitosti

Regulace působí obecně změnu srdečního výdeje, změnu objemu krve v kapacitních cévách, kontrakci či dilataci odporových cév. Při průchodu krve odporovými cévami její tlak významně klesá, což je v souladu s Hagenovým-Poiseulovým zákonem, popisujícím závislost proudového odporu na poloměru trubice, délce trubice a viskozitě kapaliny (Hagen, 1839; cit. podle Sirs, 1991, Poiseuille, 1846; cit. podle Sirs, 1991). Průtok krve je přímo úměrný čtvrté mocnině poloměru cévy:

$$\frac{\Delta V}{\Delta t} = \Delta P \times \frac{\pi}{8} \times \frac{1}{\eta} \times \frac{R^4}{L}$$

V	objem
t	čas
P	tlak
R	poloměr
L	délka
η	viskozita

V kapilárním řečišti pak nízký tlak krve umožňuje pozvolný přechod od filtrace extracelulární tekutiny k její resorpci, neboť ve venózní části kapilár transmurní tlak krve klesá pod onkotický tlak krevních bílkovin, působící směrem do lumen kapiláry. Napětí stěny cévy popisuje Laplaceův zákon (Laplace; cit. podle Moriarty, 1980):

$$P_{tm} = \frac{T}{r}$$

P_{tm}	transmurní tlak
T	napětí stěn
r	vnitřní poloměr

2.2 Nervová regulace

Krevní tlak je řízen nervově i humorálně. Rozlišujeme dlouhodobou a krátkodobou regulaci. V krátkodobé regulaci se uplatňuje modulace srdeční frekvence a vazokonstrikce či vazodilatace odporových cév. V dlouhodobém horizontu se oběhová soustava adaptuje na měnící se stav organismu i podmínky prostředí. Dlouhodobá regulace zahrnuje remodelaci cév, přizpůsobení baroreceptorů a přizpůsobení sympatického nervového systému (Korner a Angus, 1992, McCubbin et al., 1956, Osborn, 2005).

Ačkoli byly popsány i parasympatické vlivy na periferní rezistenci (Zarbis et al., 2004, Guimaraes a Moura, 2001), předpokládá se, že nervová kontrola cirkulace probíhá hlavně cestou sympatiku. Noradrenalin po navázání na α_1 receptory na buňkách hladkého svalstva odporových cév způsobuje jejich stah (Duka et al., 2000, Kanagy, 2005). Při zvýšené vazokonstrikci dochází obvykle také k venokonstrikci, která se projevuje poklesem krevních zásob ve venózní části řečiště. Zvýšená sympatická aktivita obvykle zároveň způsobuje nárůst srdeční frekvence a tepového objemu (Guimaraes a Moura, 2001).

Vlákná sympatického systému tvoří plexy v adventicii artérií. Nervová vlákna z těchto plexů zasahují až do média a na zevním povrchu hladké svaloviny tvoří četné varikozity. Dominantní roli sympatického nervového systému v regulaci krevního tlaku u potkanů SHR lze demonstrovat vyřazením sympatické inervace cév, vedoucím k dramatickému snížení KT až na úroveň pozorovanou u potkanů Wistar-Kyoto (Korner et al., 1993).

Zpětnovazebný signál při nervovém řízení krevního tlaku zajišťují baroreceptory v karotickém sinu a oblouku aorty. Reagují na zvýšení krevního tlaku a tuto informaci předávají na aferentní vlákna vedoucí do *nucleus tractus solitarii* (NTS) v prodloužené míše. V NTS se aferentní vlákna přepojují na neurony druhého řádu, které pak excitují neurony v kaudální ventrolaterální prodloužené míše (CVLM). Odtud jsou regulovány neurony v rostrální ventrolaterální prodloužené míše (RVLM) (Guyenet, 2006). RVLM je důležitým zdrojem aktivačních podnětů pregangliovým neuronům sympatického nervového systému, které řídí krevní tlak a srdeční aktivitu. Eferentní vlákna, jdoucí z RVLM, upravují krevní tlak. Tím se uzavírá zpětnovazebný okruh (Dampney et al., 2002).

Pokles krevního tlaku vede k nižší aktivitě baroreceptorů, a tím ke kompenzačnímu vzestupu krevního tlaku a srdečního výdeje. Naopak vzestup krevního tlaku vede k vyslání inhibičního signálu do prodloužené míchy a následnému poklesu vazokonstrikce a srdeční frekvence. Baroreceptory reagují dobře na krátkodobé výkyvy, ale nemohou úplně kompenzovat dlouhodobě zvýšený krevní tlak (McCubbin et al., 1956).

Sympatický nervový systém se uplatňuje i v dlouhodobém řízení oběhové soustavy. Dlouhodobá regulace aktivity sympatiku zřejmě sídlí v anteroventrální oblasti hypothalamu (AV3V). Zde jsou struktury (lamina terminalis) schopné registrovat plazmatickou hladinu hormonů regulujících krevní tlak a složení tělesných tekutin. Informace z AV3V jsou předávány do paraventrikulárního jádra (PVH) v hypothalamu, který vysílá aktivační dráhy k RVLM (Osborn, 2005).

Již u mladých SHR se projevuje zvýšená sympatická inervace cév, spojená s vyššími hladinami nervového růstového faktoru (NGF) (Donohue et al., 1989). Dále byl u SHR popsán zvýšený výdej noradrenalinu z nervových zakončení (Westfall et al., 1984) a zároveň zvýšená senzitivita cév na tohoto agonistu (Mulvany et al., 1980), což výrazně přispívá k nerovnováze vazokonstrikčních a vazodilatačních systémů (Zicha a Kuneš, 1999, Kuneš et al., 2004).

2.3 Humorální regulace

Vazokonstrikční či vazodilatační signály jsou buňkám hladkého svalstva cév předávány prostřednictvím změny membránového potenciálu, prostřednictvím NO produkovaného endotelem, nebo navázáním vazoaktivních hormonů na receptory buněčné membrány. Nejvýznamnějšími membránovými receptory jsou receptory spřažené s G proteiny. Různé G proteiny se liší svými funkcemi, mechanismus jejich aktivace je však stejný. G proteiny se stávají aktivními po navázání GTP. Když je aktivován receptor spřažený s GTP, naváže se GTP na G_{α} podjednotku, která disociuje od komplexu podjednotek G_{β} a G_{γ} .

Po určité době je GTP hydrolyzováno vlastní GTPázovou aktivitou G_{α} podjednotky, která následně asociuje se zbylými dvěma podjednotkami, a tím ztrácí svou signální funkci (Freissmuth et al., 1989). G_{α} podjednotky dělíme na základě sekvenční podobnosti do čtyř typů: $G_{q/11}$, G_s , $G_{i/o}$ a $G_{12/13}$ (Neves et al., 2002).

G_s proteiny aktivují adenylcyklázu, což vede ke zvýšení hladiny cAMP a aktivaci proteinkinázy A (PKA) (Northup et al., 1980). $G_{i/o}$ proteiny způsobují snížení aktivity adenylcyklázy (Bokoch et al., 1983). $G_{q/11}$ stimulují fosfolipázu C - β (PLC- β , vzniká inositoltrisfosfát - IP_3 a diacylglycerol – DAG) (Neves et al., 2002). Aktivace $G_{12/13}$ proteinů je spojena se stimulací Rho-kinázy. G_{13} aktivuje RhoGEF, což vede k aktivaci Rho-kinázy (Suzuki et al., 2009).

Mezi receptory spřažené s G proteiny patří také adrenergní receptory, které se dle farmakologických kritérií dělí na dvě základní skupiny – alfa (α) a beta (β) - a dále řadu podtypů. Receptory alfa způsobují kontrakci a receptory beta naopak relaxaci hladkého svalstva cév. Jejich distribuce určuje účinek katecholaminů na danou část cévního řečiště. Splanchnické artérie či artérie kosterní svaloviny v odpovědi na adrenalin díky převaze β adrenoreceptorů dilatují, zatímco renální a kožní cévy se kontrahují (Guimaraes a Moura, 2001). Pro udržování klidového napětí buněk hladké svaloviny cév i pro změny středního arteriálního tlaku mají největší význam receptory typu α_1 . Receptory α_1 se vyskytují ve stěnách tepen zejména v blízkosti nervových zakončení (Guimaraes a Moura, 2001). Jsou spřaženy s $G_{q/11}$ proteiny (Neves et al., 2002). Funkční podtypy α_1 receptorů se liší např. mírou aktivace fosfolipázy C (Theroux et al., 1996) či reakcí na dlouhodobou stimulaci (Yang et al., 1999). Receptory α_2 jsou funkčním doplňkem α_1 receptorů. Na postsynaptických neuronech zajišťují negativní zpětnou vazbu při výlevu noradrenalinu (Langer, 1974). Zejména ve stěnách malých tepen se pak podílejí na vazokonstrikci (Guimaraes a Moura, 2001). Bývají spřaženy s G_i proteiny (Neves et al., 2002). Adrenoreceptory typu β na neuronech facilitují výlev noradrenalinu (Adler-Graschinsky a Langer, 1975). U buněk hladké svaloviny cév pak způsobují dilataci. Typicky jsou spřaženy s G_s -proteiny (Neves et al., 2002). Endotelová vrstva je zvláštní tím, že exprimuje receptory typu α i typu β , výsledkem jejich aktivace je však v obou případech vazodilatace zprostředkovaná oxidem dusnatým (Guimaraes a Moura, 2001).

Hormonální regulace, jak je nyní patrné, představuje pro kardiovaskulární systém nezbytný kontrolní prvek. Kromě abnormální sekrece katecholaminů (Westfall et al., 1984) a reaktivity na ně (Mulvany et al., 1980) jsou horkými kandidáty na primární defekt ve vývoji genetické hypertenze např. poruchy renin-angiotensinového systému. Zasáhne-li v kritické vývojové periodě proti některé ze složek renin-angiotensinového systému, může to vést až k úplnému potlačení vzniku hypertenze (Zicha a Kuneš, 1999). Např. použití antisens cDNA proti AT_1 receptoru má za následek dlouhodobé potlačení rozvoje hypertenze (Sellers et al., 2001).

Důležitou roli má také mozkový renin-angiotensinový systém, který je u nedospělých SHR hyperaktivní (Phillips a Kimura, 1988). Výrazný efekt inhibice renin-angiotensinového systému je dán celou plejádou změn regulace kardiovaskulárního systému (viz přehled Zicha a Kuneš, 1999). Společným jmenovatelem poruch renin-angiotensinového systému a RhoA/Rho kinázové signální dráhy je na úrovni hladkosvalových buněk cévní stěny stimulace proliferace (Seasholtz et al., 1999, Sauzeau et al., 2001, Daemen et al., 1991).

2.4 Účinek stimulace α -adrenergních receptorů na buňky hladkého svalstva cév

Sympatický nervový systém reguluje stupeň kontrakce cév především sekrecí noradrenalinu z nervových varikozit. Tento mediátor se váže na adrenoreceptory buněk hladkého svalstva cév a působí rychlý vzestup intracelulární hladiny vápníku. Signálem pro vstup vápníku do cytosolu je aktivace fosfolipázy C s následným štěpením fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu na inositoltrisfosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG). IP_3 se váže na receptory sarkoplasmatického retikula spouštějící uvolnění intracelulárních zásob vápníku (Akata, 2007). Účinky diacylglycerolu jsou odlišné. DAG aktivuje proteinkinázu C (PKC), která fosforyluje celou řadu regulačních proteinů, mezi něž patří také Rho-kináza (Mehta et al., 2001). PKC také způsobuje depolarizaci buněk, jejíž podstatou je nejspíše aktivace neselektivních kationtových kanálů ze skupiny TRP (transient receptor potential) (Hill a Davis, 2007). Depolarizace vede k otevření napětově ovládaných vápníkových kanálů typu L (L-VDCC). Následný influx extracelulárního vápníku je spolu s aktivací Rho-kinázy příčinou déletrvající (tonické) fáze kontrakce (Somlyo a Somlyo, 2000).

Vazba noradrenalinu na α adrenoreceptory kromě stimulace fosfolipázy C také aktivuje inhibiční G_i proteiny, které snižují syntézu cAMP v buňce. Cyklické nukleotidy cAMP působí v buňkách hladké svaloviny cév synergicky s cGMP. Jejich účinkem je vazodilatace zprostředkovaná proteinkinázou A (PKA) a proteinkinázou G (PKG). Dochází přitom k fosforylaci celé škály proteinů regulujících buněčnou kontraktilitu, včetně vápníkových kanálů L-VDCC (Lucas et al., 2000). Je zajímavé, že po podání inaktivátoru inhibičních G_i proteinů (PTX, pertussis toxin) je chybějící noradrenergní vazokonstrikce částečně nahrazena aktivací cirkulujícího angiotenzinu II (což dosvědčuje prudký pokles tlaku po podání captoprilu) (Pinterova et al., 2010). cGMP vzniká v buňkách hladké svaloviny cév působením solubilní guanylátcyklázy, aktivované oxidem dusnatým (Lucas et al., 2000).

3 Iontové kanály a jejich zapojení v regulaci kontrakce cév

3.1 Napětově řízené vápníkové kanály typu L (L-VDCC)

Přítomnost napětově ovládaných iontových kanálů je nezbytným předpokladem šíření změn membránového potenciálu buněk hladké svaloviny cév (VSMC). L-VDCC jsou více-podjednotkové kanály, jejichž centrální část je tvořena podjednotkou α_1 , obsahující čtyři domény. Z nich každá čítá šest transmembránových segmentů. Centrální podjednotka α_1 zajišťuje citlivost na membránové napětí i průchod iontů do cytosolu. Zbylé podjednotky mají stabilizační, regulační a transportní funkce (Simms a Zamponi, 2012).

Potkani s genetickou hypertenzí jsou charakterizováni relativním nedostatkem oxidu dusnatého (NO) a zvýšenou aktivitou sympatiku (Kuneš et al., 2004). Vstup vápníku do buněk hladkého svalstva cév lze blokovat např. nifedipinem (antagonista L-VDCC). Nifedipin-senzitivní složka krevního tlaku představuje významnou část sympatické vazokonstrikce (Takata et al., 1983, Nelson et al., 1988). Tuto skutečnost lze demonstrovat jednoduchým pokusem. Podáme-li potkanovi nejprve nifedipin (inhibitor kanálů L-VDCC) a poté pentolinium (ganglionický blokátor sympatického přenosu), dokáže pentolinium krevní tlak ještě o něco snížit. Naopak podáme-li nejprve pentolinium, nifedipin dokáže vyvolat jen minimální snížení krevního tlaku (Paulis et al., 2007). Nifedipin-senzitivní složka krevního tlaku je u SHR zvýšená (Takata et al., 1983).

Nifedipinem indukované snížení krevního tlaku je přímo úměrné bazálnímu krevnímu tlaku (Kuneš et al., 2004). Tento jev byl pozorován nejen u mladých potkanů s rozvíjející se hypertenzí, ale také u starších potkanů. Pro SHR je typická nejen zvýšená aktivace L-VDCC, ale také změněná intracelulární regulace kanálů L-VDCC (Pratt et al., 2002).

Studie prováděné *in vitro* na femorálních arteriích SHR odhalily velké rozdíly v efektu uzavření L-VDCC na kontrakci vyvolanou stimulací adrenoreceptorů α_2 či α_1 . α_2 -adrenergní vazokonstrikce je založena na influxu vápníku L-VDCC, neboť může být potlačena podáním nifedipinu či pertusis toxinu (PTX). Vazokonstrikce zprostředkovaná α_1 receptory byla minimalizována pouze kombinací PTX a nifedipinu. Jednotlivě však tyto látky nevyvolaly výrazné snížení účinku agonisty α_1 adrenoreceptorů (Lišková, 2009; cit. podle Pintérová et al., 2009). Antagonista α_1 -adrenoreceptorů (prazosin) snižuje odpověď na noradrenalin u obou kmenů potkanů, což ukazuje obecně větší význam α_1 vazokonstrikce v odpovědi na stimulaci noradrenalinem. U SHR však nebyl rozdíl v efektu antagonistů α_1 a α_2 tak velký, což znamená zvýšenou α_2 -adrenergní vazokonstrikci u potkanů s genetickou hypertenzí (Behuliak et al., 2009).

Zvýšená sympatická aktivita, charakteristická pro SHR, souvisí s centrální aktivitou renin-angiotenzinového systému. Chronická antihypertenzní léčba blokátorem angiotenzin-konvertujícího enzymu (captopril) vede u mladých SHR k normalizaci sympatické vazokonstrikce, a to včetně její nifedipin-senzitivní komponenty (Paulis et al., 2007). Důvěryhodným vysvětlením je účinek captoprilu na centrální mechanismy regulace krevního tlaku, které jsou závislé na angiotensinu II. Captopril snižuje aktivitu sympatiku, což vede ke sníženému influxu vápníku přes L-VDCC.

Tento názor podporuje fakt, že za měsíc po přerušení léčby captoprilem se u potkanů zvýšená sympatická vazokonstrikce obnovuje (Paulis et al., 2007).

3.2 Draslíkové kanály

Draslíkové kanály představují jednu z největších a nejrozmanitějších skupin iontových kanálů. Studie evoluce iontových kanálů ukazují, že vápníkové a sodíkové kanály se pravděpodobně vyvinuly z draslíkových kanálů modifikací oblasti póru. Všechny draslíkové kanály zprostředkují rychlý a velmi selektivní transport. Jejich aktivace má na buňky hladké svaloviny cév (VSMC) obvykle hyperpolarizační účinek. Kanály mají většinou tetramerní strukturu (homotetramery či heterotetramery) (Mackinnon, 1991, Hebert et al., 2005).

Studie analyzující strukturu draslíkových kanálů hovoří o existenci tří velkých tříd. První třídu tvoří kanály, jejichž podjednotky mají šest či sedm transmembránových segmentů. Patří sem např. napětím ovládané draslíkové kanály (K_v) a draslíkové kanály aktivované vápníkem (K_{Ca}). Druhou třídou jsou kanály nazývané „inward rectifier channels“ (K_{ir}). Jejich podjednotky mají dva transmembránové segmenty. Poslední a nejrozmanitější třídou jsou „two pore“ kanály (2-P). Jejich podjednotky mají dva póry a čtyři transmembránové segmenty (Hebert et al., 2005).

Mnoho draslíkových kanálů je asociováno s regulačními proteiny. Tato skutečnost komplikuje výzkum, protože *in vitro* připravené klonované kanály takové asociované proteiny postrádají. Asociovaným proteinem může být např. kalmodulin (jako v případě SK_{Ca} kanálů – draslíkových kanálů o malé vodivosti aktivovaných vápníkem) (Hebert et al., 2005).

Již v roce 1992 demonstrovali Rusch a kol. zvýšenou kontraktilní odpověď SHR na inhibici draslíkových kanálů pomocí TEA (tetraethylamonia) (1992). Později bylo měřením vodivosti jednotlivých kanálů zjištěno, že SHR mají za normálních podmínek zvýšený příspěvek kanálů K_{Ca} k celkovému toku draslíku a zmenšený K_v proud. Při snížené intracelulární hladině vápníku je však K_v proud u potkanů SHR naopak vyšší než u WKY. Je proto možné, že u SHR mají vápníkové ionty abnormálně zvýšený inhibiční účinek na kanály K_v . Vápníkové ionty možná pozitivně regulují kanály L-VDCC a negativně kanály K_v (Cox a Rusch, 2002).

Kanály K_{Ca} (též BK_{Ca}) se otevírají v odpovědi na membránovou depolarizaci a zvýšení intracelulární hladiny vápníkových iontů. Zvýšený K_{Ca} proud je mechanismem zabraňujícím dalšímu rozvoji hypertenze a chrání zejména životně důležité orgány (Cox a Rusch, 2002). S postupem času však začíná být zjevné, že K_{Ca} kanály nejsou jen jednoduchým kompenzačním mechanismem, ale jsou ovlivňovány celou řadou hormonů. Působí na ně steroidní hormony (např. estradiol), angiotenzin II a další (Rusch, 2009). Neexistuje obecná shoda v tom, jakým způsobem se tyto kanály podílí na vzniku různých forem experimentální hypertenze (Amberg a Santana, 2003, Liu et al., 1997, Rusch a Runnels, 1994, Nieves-Cintron et al., 2007).

Endoteliální buňky exprimují celou řadu draselných kanálů. Hrají důležitou roli v regulaci membránového potenciálu buněk endotelu. V endotelu totiž nejsou exprimovány napětově řízené vápníkové kanály. Hyperpolarizace membrány (otevřením draslíkových kanálů) způsobuje aktivaci neselektivních kationtových kanálů TRPC a TRPV.

Zvýšení intracelulární koncentrace vápníku je pro endoteliální buňky obecně signálem k produkci vazodilatačních faktorů (NO, prostacyklin) (Jackson, 2005).

Hyperpolarizace endotelu, vznikající prostřednictvím draslíkových kanálů, se přenáší na myocyty (endothelium-dependent hyperpolarisation). Edwards a Weston (1998) ukázali, že SK_{Ca} a IK_{Ca} endotelu jsou aktivovány acetylcholinem a navrhli hypotézu popisující účinky tohoto významného vazodilatátoru: Nárůst koncentrace K^+ v myoendoteliálním prostoru vede k aktivaci Na^+/K^+ ATPázy a kanálů K_{ir} , což vede k hyperpolarizaci svalových buněk (Edwards et al., 1998). Endoteliální buňky jsou mezi sebou propojeny gap junctions, a stejným způsobem komunikují i se svalovými buňkami, což představuje další možnost šíření změny membránového napětí (Griffith, 2004). Je známo, že u SHR je oslabena hyperpolarizace závislá na endotelu. Byla také popsána snížená exprese kanálů SK_{Ca} a K_{ir} v endoteliálních buňkách SHR (Garland, 2010).

EDH se u forem hypertenze charakteristických sníženou produkcí NO může uplatňovat výrazněji než za normálního stavu organismu. Nárůst krevního tlaku vyvolaný injekcí TEA je výrazně vyšší, předchází-li jeho podání inhibice syntázy oxidu dusnatého.

NO a EDH se v regulaci vazokonstrikce zřejmě vzájemně doplňují. Snížení produkce NO podporuje vliv EDH na kanály K_{Ca} s cílem dosáhnout dostatečné membránové hyperpolarizace. Toto nahrazení funkce NO hyperpolarizací závislou na endotelu se více uplatňuje u chronické než u akutní inhibice NO syntázy (Gerová, 1999).

3.3 Kanály TRP (transient receptor potential)

TRP jsou z hlediska aktivace a propustnosti velmi různorodá skupina neselektivních kationtových kanálů. S výjimkou TRPM4/5 jsou propustné pro mono- i divalentní kationty. TRP jsou nezbytné pro funkci většiny smyslů, kontrolu sekrece hormonů i embryonální vývoj. Jejich funkcí je zejména ovlivnění intracelulární hladiny vápníkových iontů (Nelson et al., 2011).

Genová rodina TRP obsahuje přes dvacet genů. Na základě sekvenční homologie rozlišujeme tři velké rodiny: vaniloidní (TRPV), kanonické (TRPC) a melastatinové (TRPM). Dále existují tři menší rodiny: polycystinové (TRPP), mucolipinové (TRPML) a ankyrinové (TRPA). Obecně jsou TRP kanály aktivovány nejrůznějšími stimuly. Mohou reagovat na změny tlaku, teploty, osmolarity a intracelulární koncentrace Ca^{2+} a fungují také jako receptory různých signálních metabolitů (např. epoxyeikosatrienové kyseliny) (Brayden et al., 2008). V buňkách hladké svaloviny cév jsou nejvíce exprimovány kanály TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6, TRPM4, TRPV2 a TRPV4. Jejich funkce zřejmě souvisí s odpovědí na změnu osmotických poměrů nebo napětí stěny cév (Nelson et al., 2011).

3.3.1 TRPC (canonical)

Inhibice TRPC6 vede k potlačení depolarizace, která je za normálních okolností vyvolána vysokým intravaskulárním tlakem (Welsh et al., 2002). Myši s knockoutovaným genem pro TRPC6 mají však paradoxně zvýšenou kontraktilitu cév a zvýšený krevní tlak.

Následkem umlčení genu pro TRPC6 je totiž zvýšená exprese TRPC3. TRPC3 může s TRPC6 tvořit heteromultimerní kanály a v nepřítomnosti TRPC6 vede jeho neustálá aktivita ke zvýšení exprese (Dietrich et al., 2005). Použití antisens DNA proti TRPC6 v kultuře buněk hladké svaloviny cév vede k potlačení influxu kationtů vyvolaného stimulací α_1 adrenoreceptorů. TRPC6 je možná významný pro influx vápníku během sympatické stimulace (Inoue et al., 2001).

U myši s knockoutovaným genem pro TRPC4 byl prokázán snížený influx vápníku do endoteliálních buněk (Freichel, 2001).

3.3.2 TRPM (melastatin)

Z kanálů z rodiny TRPM stojí za pozornost zejména TRPM4/5. Propouštějí pouze monovalentní ionty (převážně sodík) a jsou jako jediné TRP aktivovány vápníkem. Bývají také nazývány Ca^{2+} -aktivované neselektivní kationtové kanály (CANs). Způsobují buněčnou depolarizaci (Nelson et al., 2011). TRPM6/7 jsou kanály s enzymatickou aktivitou (chanzymes), mají totiž kinázovou doménu. Kontrolují hospodaření s hořčíkem. Mutace TRPM6 může vést k hypomagnesii spojené se sekundární hypokalcémií. Dysfunkce TRPM7 v buňkách hladké svaloviny cév SHR může být zodpovědná za charakteristickou poruchu homeostázy hořčíku (Brayden et al., 2008, Kisters et al., 2004).

4 RhoA/Rho kinázová signální dráha

4.1 RhoA

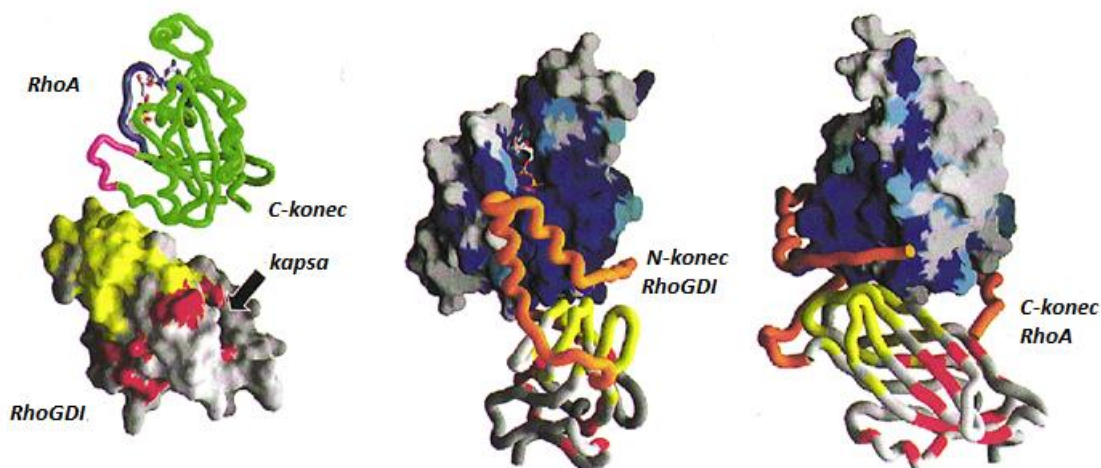
Monomerní GTPázy Rho jsou významnými regulátory aktinového cytoskeletu a kontraktility buněk hladkého svalstva. Hlavním efektozem Rho GTPáz je ROCK (Puetz et al., 2009, Matsui et al., 1996). RhoA, RhoB a RhoC působí aktivačně. Známe ale také inhibiční GTPázy, které váží ROCK a deaktivují ji. Patří mezi ně např. RhoE (Loirand a Pacaud, 2010).

Rho GTPázy ve spolupráci s Rho kinázou regulují expresi genů, které jsou klíčové pro vývoj a udržení kontraktilního fenotypu buněk hladké svaloviny. Mezi tyto geny patří např. α -aktin nebo těžký řetězec myosinu (Wamhoff et al., 2006). K udržení kontraktilního fenotypu je vyžadováno mechanické zatížení buněk (napětí stěny cévy) (Albinsson et al., 2004). Rho-kinázová signální dráha je důležitá pro správný průběh proliferace, migrace a diferenciac buněk hladkého svalstva cév (Discher et al., 2005, Clark a Brugge, 1995, Bi et al., 2005, Zeidan et al., 2003). K naplnění těchto různorodých funkcí je často zapotřebí spolupráce několika členů rodiny Rho a jejich regulačních proteinů (Puetz et al., 2009).

RhoA, která je nejprozkoumanějším členem skupiny Rho, může být aktivována nejen adrenergními, ale také muskarinovými či purinovými receptory, a dále receptory oxytocinu, epidermálního růstového faktoru, ephrinů, semaforinů, angiotensinu II a lyzofosfolipidovými receptory (Riobo a Manning, 2005, Gohla et al., 2000). Existuje velké množství vazokonstrikčních látek a omezené množství různých G proteinů spojených s jejich receptory. Informační hodnota signálů přicházejících z okolí však zůstává zachována díky komplexitě signálních kaskád, které tyto G proteiny spouštějí. Většina receptorů vazokonstrikčních látek aktivuje přes své specifické receptory více druhů α podjednotek G proteinů ($G_{q/11}$, $G_{12/13}$, G_i) (Riobo a Manning, 2005). V klidovém stavu se RhoA nachází převážně v cytosolu, kde je vázána na GDIs (GDP dissociation inhibitors, viz obr. 2). GDIs stíní C-terminální geranylylovou skupinu RhoA a brání jejímu přesunu do buněčné membrány. Jak tedy dochází k přenosu signálu z G proteinů? Zprostředkovateli aktivačního signálu jsou GEFs (guanine nucleotide exchange factors). Díky aktivaci GEFs se RhoA odpoutává od GDIs a GDP je na ní vyměněno za GTP (Puetz et al., 2009).

V buňkách hladké svaloviny bylo nalezeno pět GEFs. Jsou to LARG, PDZ-RhoGEF, p115 RhoGEF, Vsm-RhoGEF a SmgGDS. Jejich aktivita je regulována velmi komplexním způsobem a obecně zahrnuje interakce protein-protein a protein-lipid. Díky těmto interakcím jsou GEFs lokalizovány do míst, kde je jich zapotřebí. Zatímco GDIs a GAPs (GTPase activating proteins) se chovají „promiskuitně“ a interagují s různými proteiny ze skupiny Rho, GEFs jsou velmi specifické. Dobře popsána je signalizace pomocí Rho GEFs obsahujících RGS doménu. Tyto GEFs interagují s $G_{\alpha_{12/13}}$ proteiny (LARG, PDZ-RhoGEF, p115 RhoGEF). RGS doména facilite štěpení GTP a tím inaktivaci α podjednotky G proteinu spáženého s receptorem. Rho GEF se aktivuje, zatímco G protein je inaktivován. Následně je aktivační signál předán RhoA (Puetz et al., 2009).

GAPs (GTPase activating proteins) jsou skupinou enzymů, které spouštějí GTPázovou aktivitu Rho. Inhibice GAPs postačuje k aktivaci Rho bez přítomnosti vnějších stimulů (Olofsson, 1999).



Obrázek 2: Interakce RhoA s RhoGDI. Na RhoA je modře vyznačen switch 1 a růžově switch 2. Povrch Rho GDI je vybarven na základě rezonančních posunů NMR. Aminokyselinové postranní zbytky ovlivněné přidáním neprenylovaného Cdc42 jsou vyznačeny žlutě. Postranní zbytky ovlivněné přidáním prenylovaného Cdc42 jsou vyznačeny červeně. N-koncová doména RhoGDI odpovídá AMK 24 – 68. C-koncová doména RhoA odpovídá AMK 181-190. AMK v rámci rodiny Rho konzervované jsou značeny modře (tmavá modř značí 100% konzervovanost) (upraveno podle Somlyo a Somlyo, 2000).

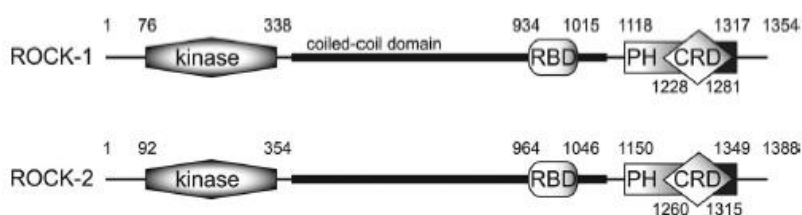
4.2 Rho-kináza

4.2.1 Struktura ROCK

Rho-kináza je serin-threoninová kináza o molekulové hmotnosti přibližně 160 kDa. Většina molekul ROCK je lokalizována v cytoplazmě a ROCK aktivované RhoA se přesouvají do buněčné membrány (Leung et al., 1995, Matsui et al., 1996). Konsenzus sekvence fosforylované Rho-kinázou je RXXS/T či RXS/T (Loirand et al., 2006).

Každý jedinec má dvě izoformy Rho kinázy. U obou izomerů Rho kinázy se katalytická doména nachází na N-konci. V C-koncové části se nachází doména vážící Rho protein (RBD), Pleckstrin homology doména (PH) a doména bohatá na cystein (CRD, viz obr. 3). Sekvence AMK izoenzymů ROCK-1 a ROCK-2 mají celkovou identitu 65 %. Identita v RBD je 58 % a nejvyšší identita (92 %) je v kinázové doméně (Nakagawa et al., 1996). Izoformy se liší svojí expresí v jednotlivých orgánech. V cévách a srdci jsou exprimovány obě izoformy (Nunes et al., 2010).

V lidském genu pro ROCK-2 existuje polymorfismus – AMK na pozici 431 může být threonin nebo asparagin. Genotyp Asn/Asn je asociován s vyšším klidovým systolickým tlakem a razantnějším zvýšení tlaku při stresu (chlad). Zvyšování KT je v tomto případě důsledkem zvyšování periferní rezistence, neboť srdeční výdej, poddajnost velkých cév a hormonální poměry zůstávají nezměněny (Seasholtz et al., 2006). Existuje také polymorfismus, který u svých nositelů naopak snižuje riziko vzniku hypertenze. Skládá se ze čtyř SNP (single nukleotide polymorphism) v úseku kódujícím kinázovou podjednotku a je geneticky podmíněn recesivně (Rankinen et al., 2008).



Obrázek 3: Molekulární struktura Rho-kináz. Kinázová doména je lokalizována v blízkosti N-konce. Je následována coiled-coil doménou, doménou vážící Rho (RBD), Pleckstrin homology doménou (PH) a doménou bohatou na cystein (CRD - cysteine rich domain). ROCK-1 a ROCK-2 jsou vysoce homologní. Veškeré zkratky jsou uvedeny v seznamu zkratk (upraveno dle Loirand et al., 2006).

4.2.2 Regulace aktivity ROCK

C-konec molekuly ROCK zřejmě funguje jako autoinhibiční doména, protože zkrácená ROCK, postrádající domény RBD a PH, je konstitutivně aktivní (ke zkrácení dochází např. v průběhu apoptózy) (Sebbagh et al., 2001). Navázání RhoA (s navázaným GTP) aktivuje ROCK, protože kinázová a inhibiční doména k sobě nadále nejsou přitahovány. Stimulační efekt RhoA odpovídá asi 1,5 až 2 násobnému posílení aktivity ROCK (Feng et al., 1999). ROCK je kromě RhoA stimulována i dalšími látkami, jako např. lipidy. Kyselina arachidonová stimuluje ROCK nezávisle na RhoA při pětinasobném až šestinasobném zvýšení její *in vitro* aktivity (Feng et al., 1999). Za fyziologického stavu tvoří RhoA dimery (Doran et al., 2004).

Známa je také negativní regulace ROCK. Malá GTPáza RhoE se může navázat na N-terminální část ROCK-1 a zabránit její aktivaci. RhoE je prvním substrátem, u něhož byla prokázána specifická fosforylace pouze jednou z izoform Rho-kinázy (ROCK-1) (Loirand et al., 2006).

Některé studie poukazují na prostorovou regulaci Rho-kinázy. Je dokázáno, že krátce po stimulaci kontrakce je MLC₂₀ fosforylován v centrální oblasti buňky, zatímco v pozdější fázi dochází k fosforylaci v oblasti buněčného kortexu (tj. oblasti při vnitřním povrchu plazmatické membrány). Není však jasné, zda tento jev má pro aktivaci Rho-kinázy praktický význam (Bolz et al., 2003, Neppi et al., 2009, Shin et al., 2002).

4.2.3 Substráty ROCK

4.2.3.1 Fosfatáza lehkého řetězce myosinu (MLCP)

Bylo popsáno více než 15 substrátů ROCK. Jedním z nejdůležitějších je její cílové místo na MLCP (MYPT-1, myosin phosphatase targeting subunit) (Kimura et al., 1996). Nativní MLCP může být purifikována jako trimer. Má katalytickou podjednotku, podjednotku vážící myosin (MYPT1) a malou nekatalytickou podjednotku neznámé funkce. Existuje mnoho kináz, které fosforylují MYPT1 a tím MLCP inhibují. Fosforylace MYPT1 pomocí ROCK-2 má však za následek výrazné zvýšení kontaktility VSMC. Hlavními místy fosforylace pomocí ROCK (v rámci MYPT1) jsou Thr853 a Thr696 (Nunes et al., 2010). Thr696 je však patrně fosforylován nepřímo pomocí kinázy ZIPK (Puetz et al., 2009). K fosforylaci MYPT1 dochází v buňkách hladké svaloviny cév až na přechodu do tonické fáze kontrakce (Dimopoulos et al., 2007).

4.2.3.2 Kináza lehkého řetězce myosinu (MLCK)

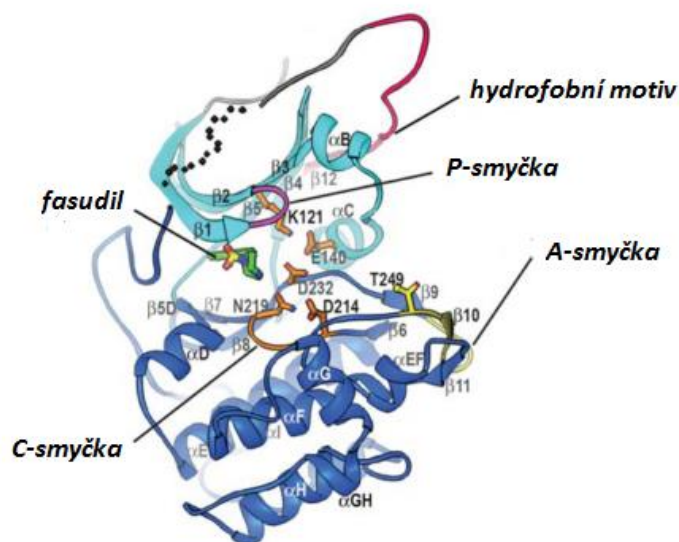
Substrátem ROCK-2 je (alespoň *in vitro*) také kináza lehkého řetězce myosinu (MLCK). Fosforylace probíhá na Ser19. Tato fosforylace však zvyšuje kontraktilitu VSMC pouze minimálně (Iizuka et al., 1997).

4.2.3.3 Protein kinase C (PKC)–potentiated myosin phosphatase inhibitor (CPI-17)

CPI-17 je malý regulační protein, který inhibuje MLCP navázáním na její fosfatázovou podjednotku. Je rovněž substrátem ROCK. CPI-17 je společným substrátem ROCK a proteinkinázy C (Yamawaki et al., 2001, Eto et al., 1995). Souhra signálních drah vedoucích přes ROCK a PKC je nezbytná pro správný průběh kontrakce a je zatím málo prozkoumána.

4.2.4 Inhibitory ROCK

Abychom mohli posoudit, jakou důležitost má RhoA/Rho kinázová signální dráha pro vznik genetické hypertenze, je důležité porozumět vlastnostem používaných inhibitorů. Nejčastěji užívaným inhibitorem ROCK je Y-27632. Tento inhibitor kompetuje o ATP-vazebné místo, čímž zabraňuje kinázové aktivitě. Má přijatelnou specifitu – inhibiční činky na PKC, PKA a MLCK jsou mnohem nižší, avšak inhibuje se stejnou afinitou kinázu PRK (Rho-dependent PCK-related kinase I) (Wirth, 2010, Davies et al., 2000). Fasudil (HA1077) je inhibitor, který rovněž kompetuje o ATP-vazebné místo (viz obr. 4). Má inhibiční účinek na PKA a PKC (hodnoty IC_{50} asi 5x a 30x vyšší než pro ROCK). Hydroxyfasudil, hlavní metabolit fasudilu při orálním podání, inhibuje ROCK účinněji ($IC_{50} = 0,7 \mu\text{l/mol}$ oproti $1 \mu\text{l/mol}$ u fasudilu) (Hattori et al., 2004). Modifikací fasudilu byla vytvořena látka H1152P, která specificky inhibuje ROCK-2 a má slabší inhibiční účinek na PKA a PKC (Tamura et al., 2005).



Obrázek 4: Kinázová doména ROCK s navázaným fasudilem. N-terminální výběžek je znázorněn tmavě modře. C-terminální výběžek je světle modrý. Červeně je znázorněn hydrofobní motiv na C-konci. Katalyticky významné AMK zbytky jsou označeny (Lys121, Glu140, Asp214, Asn219, Asp232). Tečkovaně je vyznačena oblast kontaktu C-terminálního a N-terminálního výběžku, která z důvodu kvality dat nebyla do modelu zahrnuta (upraveno dle Yamaguchi et al., 2006).

5 Úloha RhoA/Rho kinázové dráhy v regulaci krevního tlaku SHR

5.1 Účinky inhibice Rho-kinázy na periferní rezistenci

Výši krevního tlaku ovlivňují svojí konstrikcí především odporové cévy (malé artérie a arterioly). V odporových cévách SHR byla zjištěna zvýšená odpověď na kontraktilní agonisty a také zvýšený myogenní tonus. Je zřejmé, že oba mechanismy zprostředkující kontrakci buněk VSMC působí ve stejném místě a čase a mohou spolu interagovat (Izzard et al., 1996).

Vápníková senzitivace zahrnuje nejen RhoA-signální dráhu, ale také dráhy spojené s PKC (proteinkinázou C) ILK (integrin-like kinases), MAPK-aktivovanou kinázou 1b, MAPK-aktivovanou kinázou 2 a ZIPK (zipper-interacting proteinkinase) (Niino a Ikebe, 2001, Ikebe et al., 1987, Komatsu a Hosoya, 1996, Suizu et al., 2000, Deng et al., 2001). Abychom mohli posoudit příspěvek RhoA-signální dráhy ke zvýšenému tlaku SHR, je žádoucí tyto paralelní dráhy rozlišovat. Vzájemné vazby mezi nimi však nejsou zcela prozkoumány. Za Rho-kinázovou složku krevního tlaku se obecně označuje změna krevního tlaku vyvolaná použitím Rho-kinázového inhibitoru.

Vápníková senzitivace musí být koordinována se vstupem vápníku z okolí. Již dlouho je známo, že KT hypertenzních zvířat lze snížit podáním inhibitorů vápníkových kanálů (Takata et al., 1983). Vstup vápníku těmito kanály není zcela nezávislý na vápníkové senzitivaci, např. proto, že GPCR aktivující Rho-kinázovou signální dráhu mohou zároveň aktivovat PLC- β a nepřímo způsobovat depolarizaci. Pokusy s nifedipinem (selektivní blokátor L-VDCC) ukázaly zvýšený příspěvek L-VDCC ke krevnímu tlaku SHR (Paulis et al., 2007). Rovněž byla prokázána upregulace exprese α_{1C} podjednotky kanálu (Pratt et al., 2002).

Při zkoumání úlohy ROCK v regulaci kontrakce VSMC představuje vstup extracelulárního vápníku zásadní problém. Při současném vstupu vápníku a probíhající senzitivaci je totiž obtížné rozlišit, zda k fosforylaci lehkého řetězce myosinu dochází díky posílení aktivity MLCK či činnosti ROCK. Srovnáním inhibice L-VDCC s inhibicí ROCK si můžeme vytvořit alespoň rámcovou představu o relativním příspěvku těchto drah ke kontrakci VSMC. Část výsledků studie provedené na oddělení Experimentální hypertenze AV ČR uvádím v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1

Dávkování: Fasudil-kumulativně 0,5; 1; 2; 4 a opět 2 mg/kg. Nifedipin-kumulativně 0,05; 0,1; 0,2 a 0,4 mg/kg. (upraveno podle Behuliak et al., 2012)

Kmen	WKY	SHR	WKY	SHR
Látka	<i>Fasudil</i>	<i>Fasudil</i>	<i>Nifedipin</i>	<i>Nifedipin</i>
Změna KT [mm Hg]	-39±2	-61±3	-16±4	-75±2
Změna KT [% bazálního KT]	-38±1	-26±3	-15±1	-38±2

Výsledky v souladu s dřívějšími pracemi ukazují na vyšší influx vápníku u SHR (Takata et al., 1983). Nový pohled na vápníkovou senzitivizaci nám však nabízí srovnání s účinky fasudilu. Z něj vyplývá, že vstup vápníku kanály L-VDCC má u SHR patrně větší význam než vápníková senzitivizace. Blokáda L-VDCC má za daných podmínek v procentech bazálního tlaku u SHR asi 1,5x větší účinek než blokáda ROCK (Behuliak et al., 2012).

Studie zabývající se úlohou Rho-kinázy v regulaci KT u potkanů SHR jí označují za klíčový enzym. Tento názor je podpořen zejména následujícími fakty:

- 1) Akutní inhibice Rho-kinázy způsobuje u SHR výrazné snížení KT, a to větší než u WKY.
- 2) Aplikace inhibitorů Rho-kinázy snižuje kontraktilitu cév.
- 3) Inhibice Rho-kinázy zvyšuje syntézu NO v endotelu.

Ad 1) Akutní inhibice Rho kinázy způsobuje u SHR výrazné snížení KT, a to větší než u WKY.

Tato skutečnost je široce přijímána a podporuje jí řada studií (Uehata et al., 1997, Mukai et al., 2001). Průkopnická práce M. Uehata a kol. z roku 1997 uvádí, že podáním Y-27632 (30 mg.kg^{-1}) bylo u samců SHR dosaženo snížení KT o 80 mm Hg. Tento maximální účinek se projevil tři hodiny po požití látky. Při stejném uspořádání pokusu dosahovali potkani kmene WKY snížení KT maximálně o 20 mm Hg (Uehata et al., 1997).

Uehata uvádí, že inhibitor Rho-kinázy Y-27632 „neměl žádný efekt na vápníkem vyvolanou kontrakci“. Toto tvrzení se zdá být v rozporu s výše uvedenými výsledky Behuliakovy práce a neodpovídá zcela v současnosti funkčnímu modelu dynamické rovnováhy mezi vápníkovou aktivací kalmodulinem a vápníkovou senzitivizací (viz obr. 1) (Somlyo a Somlyo, 2000, Akata, 2007). Aktivita Rho-kinázy není nezávislá na vstupu extracelulárního vápníku do buňky (Behuliak et al., 2012, Dhaliwal et al., 2007).

Faktorem znesnadňujícím interpretaci účinků inhibitorů Rho-kinázy je časový průběh jejich působení a vliv způsobu podání (perorální vs. intravenózní). Účinek inhibitorů na potkany WKY trvá zhruba jen dvě hodiny, zatímco na SHR delší dobu (Behuliak et al., 2012). Při orálním způsobu podání je dosaženo většího účinku na potkany SHR než na WKY (Uehata et al., 1997, Mukai et al., 2001). Bezprostřední pozorování efektu inhibitorů Rho-kinázy však umožní spíše intravenózní podání. Při intravenózním podání byl popsán významný účinek inhibitorů ROCK i na normotenzní potkany (Dhaliwal et al., 2007, Lohn et al., 2005).

Ad 2) Aplikace inhibitorů Rho-kinázy snižuje kontraktilitu cév.

Y. Mukai a kol. (2001) zkoumali účinek hydroxyfasudilu na různé artérie (koronární, mezenterické, karotidy) (Mukai et al., 2001). Z jejich dat můžeme vyčíst, že u mezenterické artérie hydroxyfasudil vyvolal průměrné snížení odpovědi na fenylefrin 32 % u mladých a 23 % u dospělých SHR potkanů, což představuje větší efekt než u WKY (20 % mladí, 10 % dospělí). Zvýšenou senzitivitu cév SHR k působení inhibitorů ROCK popsali také Asano a Nomura (2003) či Chissobolis a Sobey (2001).

V absolutních číslech vzhledem k vyššímu bazálnímu krevnímu tlaku SHR žádná studie nehovoří proti vyššímu účinku inhibitorů Rho-kinázy na cévy SHR.

Avšak při vyjádření v procentech bazálního tlaku či maximální kontrakce lze s vyšším účinkem na cévy SHR polemizovat (viz Tab. 1). Inhibice Rho-kinázy měla shodný efekt na cévy SHR a WKY např. podle studie Löhna a kol. (2005). Příčina rozporů mezi studiemi není známa. Nelze vyloučit genetické rozdíly mezi jednotlivými liniemi SHR potkanů.

Ad 3) Inhibice Rho-kinázy zvyšuje syntézu NO v endotelu.

Studie Wolfruma a kol. (2004) uvádí, že hydroxyfasudil stimuluje fosforylaci a aktivaci Akt (proteinkinázy B), která následně aktivuje endoteliální NO syntázu (eNOS). Shodné účinky vykazuje také Y-26732. Aktivace RhoA a Rho-kinázy podle Laufse a Liao (1998) snižuje v endotelu expresi endoteliální NO syntázy cestou destabilizace její mRNA.

U myši s knockoutovaným genem pro eNOS však nebyla zaznamenána menší odpověď na inhibici Rho-kinázy, jak bychom očekávali (Lohn et al., 2005). Pokud by byl efekt inhibitorů Rho-kinázy zprostředkován endotelem, očekávali bychom, že v přítomnosti statinů nebude možné acetylcholinem vyvolat relaxaci závislou na endotelu. V přítomnosti statinů není totiž RhoA geranylována a nemůže se uchytit v membráně. Tento předpoklad se však nepotvrdil (Budzyn et al., 2004).

Efekt inhibitorů Rho-kinázy na KT zcela jistě není limitován pouze na modulaci aktivity eNOS. Úloha Rho-kinázy v regulaci produkce oxidu dusnatého však dosud není zcela objasněna.

5.2 Působení Rho-kinázy na úrovni organismu

Rho-kináza se účastní regulace krevního tlaku nejen na úrovni cév, ale i centrálně. Několik prací upozornilo na skutečnost, že Rho-kináza v mozku působí vzestup sympatické aktivity, vedoucí ke zvýšení KT. V dření nadledvin může Rho-kináza stimulovat produkci katecholaminů.

Mikroinjekce Y-27632 v *nucleus tractus solitarii* (NTS) způsobuje akutní snížení bazálního krevního tlaku (Ito et al., 2003). Zvýšená aktivita ROCK v NTS potkanů SHR je spojena s nižší citlivostí neuronů tohoto centra ke glutamátu (Ito et al., 2005). Pokles sympatické aktivity po podání fasudilu je u SHR provázen akutním snížením syntézy noradrenalinu a adrenalinu (větším než u WKY) (Ito et al., 2003).

Při několikadenním orálním podávání fasudilu se u SHR projevuje snížená exprese tyrosinhydroxylázy a snížená tvorba katecholaminů v dření nadledvin, přičemž tento pokles je procentuálně vyšší u SHR než u WKY. Jelikož je činnost dřeně nadledvin pod kontrolou sympatického systému, může být účinek fasudilu zprostředkován nervově (Kumai et al., 2007).

Je zapotřebí dalších výzkumů, které objasní vztahy mezi centrálními a periferními aktivitami Rho-kinázy.

6 Závěr

Mezi regulačními mechanismy krevního tlaku vyniká a je intenzivně studován zejména sympatický nervový systém. U potkanů SHR byla prokázána jeho zvýšená aktivita.

Mechanismus regulace kontraktility cév sekrecí noradrenalinu z nervových varikozit je znám již dlouhou dobu. Po navázání noradrenalinu na receptory buněk hladké svaloviny dochází k uvolnění vápníkových iontů ze sarkoplazmatického retikula a depolarizaci plazmatické membrány. Depolarizace vede k influxu extracelulárního vápníku a je spolu s aktivací Rho-kinázy příčinou déletrvajících (tonické) fáze kontrakce.

Iontové kanály endotelu a buněk hladké svaloviny cév regulují membránový potenciál a vstup vápníku do buněk. Zásadním způsobem proto ovlivňují kontraktilitu cév. Změněná propustnost plazmatické membrány VSMC buněk SHR pro jednotlivé ionty je dána abnormalitami nervového a endokrinního systému spolu se změněnou intracelulární regulací iontových kanálů. V důsledku toho je propustnost plazmatické membrány pro vápníkové ionty vyšší a i přes existenci kompenzačních mechanismů vede zvýšený vstup vápníku k vyšší kontraktilitě buněk hladké svaloviny cév.

Současné práce hovoří o dynamické rovnováze mezi influxem vápníku a vápníkovou senzitivací. Je realizována stupněm fosforylace regulačních podjednotek myosinu. Substrátem Rho-kinázy je fosfatáza lehkého řetězce myosinu (MLCP). Její inaktivací se zvyšuje podíl fosforylovaného myosinu a zvyšuje se příspěvek vápníkové senzitivace k buněčné kontraktilitě. Vyšší aktivita Rho-kinázy obvykle znamená vyšší stupeň kontrakce cév.

Na základě předložených faktů se zdá, že RhoA/Rho kinázová signální dráha má výrazný podíl na regulaci krevního tlaku u potkanů kmenů SHR i WKY, neboť se účastní regulace stahu buněk hladké svaloviny cév. Mezi další potenciálně významné aktivity Rho-kinázy patří ovlivnění centrálního sympatického nervového systému, sekrece katecholaminů či proliferace fibroblastů cévní stěny. Rozdílných výsledků dosáhly studie zabývající se úlohou Rho-kinázy v endotelu. Vysoká efektivita inhibitorů Rho-kinázy je příslibem pro budoucí léčbu kardiovaskulárních onemocnění.

Doufám, že se má práce stane užitečným pomocníkem pro všechny, kdo hledají průsečíky mezi molekulární biologii a fyziologií oběhové soustavy.

Literatura

- Adler-Graschinsky, E. & Langer, S. Z. 1975. Possible role of a beta-adrenoceptor in the regulation of noradrenaline release. *British Journal of Pharmacology*, **53**, 43-50.
- Akata, T. 2007. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca(2+) concentration and the Ca(2+)-dependent regulation of vascular tone. *Journal of Anesthesia*, **21**, 220-231. Review
- Albinsson, S., Nordstrom, I. & Hellstrand, P. 2004. Stretch of the vascular wall induces smooth muscle differentiation by promoting actin polymerization. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 34849-34855.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. & Kaibuchi, K. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 20246-20249.
- Amberg, G. C. & Santana, L. F. 2003. Downregulation of the BK channel beta 1 subunit in genetic hypertension. *Circulation Research*, **93**, 965-971.
- Asano, M. & Nomura, Y. 2003. Comparison of inhibitory effects of Y-27632, a Rho kinase inhibitor, in strips of small and large mesenteric arteries from spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Hypertension Research*, **26**, 97-106.
- Behuliak, M., Pintérová M, Bencze, M., Petrová, M., Líšková, S., Karen, P., Kuneš, J., Vaněčková, I. & Zicha, J. Ca2+ sensitization and Ca2+ entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. 2013 *submitted to Journal of Hypertension*
- Behuliak, M., Pintérová, M., Kuneš, J. & Zicha, J. 2009. The influence of nifedipine on the contribution of alpha-1-and alpha-2-adrenergic vasoconstriction to pressor effects of exogenous norepinephrine in WKY and SHR rats. *Hypertension*, **54**, 1177-1177.
- Bi, D., Nishimura, J., Niirō, N., Hirano, K. & Kanaide, H. 2005. Contractile properties of the cultured vascular smooth muscle cells - The crucial role played by RhoA in the regulation of contractility. *Circulation Research*, **96**, 890-897.
- Bokoch, G. M., Katada, T., Northup, J. K., Hewlett, E. L. & Gilman, A. G. 1983. Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *Journal of Biological Chemistry*, **258**, 2072-2075.
- Bolz, S. S., Vogel, L., Sollinger, D., Derwand, R., Boer, C., Pitson, S. M., Spiegel, S. & Pohl, U. 2003. Sphingosine kinase modulates microvascular tone and myogenic responses through activation of RhoA/Rho kinase. *Circulation*, **108**, 342-347.
- Brayden, J. E., Earley, S., Nelson, M. T. & Reading, S. 2008. Transient receptor potential (TRP) channels, vascular tone and autoregulation of cerebral blood flow. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **35**, 1116-1120.
- Budzyn, K., Marley, P. D. & Sobey, C. G. 2004. Chronic mevastatin modulates receptor-dependent vascular contraction in eNOS-deficient mice. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **287**, R342-R348.
- Chrissobolis, S. & Sobey, C. G. 2001. Evidence that Rho-kinase activity contributes to cerebral vascular tone in vivo and is enhanced during chronic hypertension - Comparison with protein kinase C. *Circulation Research*, **88**, 774-779.
- Clark, E. A. & Brugge, J. S. 1995. Integrins and signal-transduction pathways - the road taken. *Science*, **268**, 233-239.

- Cox, R. H. & Rusch, N. J. 2002. New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure. *Microcirculation*, **9**, 243-257. Review
- Daemen, M., Lombardi, D. M., Bosman, F. T. & Schwartz, S. M. 1991. Angiotensin-II induces smooth-muscle cell-proliferation in the normal and injured rat arterial-wall. *Circulation Research*, **68**, 450-456.
- Dampney, R. A. L., Coleman, M. J., Fontes, M. A. P., Hirooka, Y., Horiuchi, J., Li, Y. W., Polson, J. W., Potts, P. D. & Tagawa, T. 2002. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **29**, 261-268. Review
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. & Cohen, P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal*, **351**, 95-105.
- Deng, J. T., Van Lierop, J. E., Sutherland, C. & Walsh, M. P. 2001. Ca²⁺-independent smooth muscle contraction - A novel function for integrin-linked kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 16365-16373.
- Dhaliwal, J. S., Casey, D. B., Greco, A. J., Badejo, A. M., Gallen, T. B., Murthy, S. N., Nossaman, B. D., Hyman, A. L. & Kadowitz, P. J. 2007. Rho kinase and Ca²⁺ entry mediate increased pulmonary and systemic vascular resistance in L-NAME-treated rats. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **293**, L1306-L1313.
- Dietrich, A., Schnitzler, M. M. Y., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaya, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., Essin, K., Pinkenburg, O., Luft, F. C., Gudermann, T. & Birnbaumer, L. 2005. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6(-/-) mice. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 6980-6989.
- Dimopoulos, G. J., Semba, S., Kitazawa, K., Eto, M. & Kitazawa, T. 2007. Ca²⁺ dependent rapid Ca²⁺ sensitization of contraction in arterial smooth muscle. *Circulation Research*, **100**, 121-129.
- Discher, D. E., Janmey, P. & Wang, Y. L. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, **310**, 1139-1143. Review
- Donohue, S. J., Head, R. J. & Stitzel, R. E. 1989. Elevated nerve growth-factor levels in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **14**, 421-426.
- Doran, J. D., Liu, X., Taslimi, P., Saadat, A. & Fox, T. 2004. New insights into the structure-function relationships of Rho-associated kinase: a thermodynamic and hydrodynamic study of the dimer-to-monomer transition and its kinetic implications. *Biochemical Journal*, **384**, 255-262.
- Duka, I., Gavras, I., Johns, C., Handy, D. E. & Gavras, H. 2000. Role of the postsynaptic alpha(2)-adrenergic receptor subtypes in catecholamine-induced vasoconstriction. *General Pharmacology-the Vascular System*, **34**, 101-106.
- Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J. & Weston, A. H. 1998. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, **396**, 269-272.
- Eto, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya, K. & Morita, F. 1995. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein-kinase-C - isolation from porcine aorta media and characterization. *Journal of Biochemistry*, **118**, 1104-1107.
- Feng, J. H., Ito, M., Kureishi, Y., Ichikawa, K., Amano, M., Isaka, N., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K., Hartshorne, D. J. & Nakano, T. 1999. Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 3744-3752.
- Freichel, M., Suh, S. H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V. & Nilius, B. 2001. Lack of an

- endothelial store-operated Ca^{2+} current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4(-)/(-) mice. *Nature Cell Biology*, **3**, 121-127.
- Freissmuth, M., Casey, P. J. & Gilman, A. G. 1989. G-proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB Journal*, **3**, 2125-2131. Review
- Garland, C. J. 2010. Compromised vascular endothelial cell SKCa activity: a fundamental aspect of hypertension? *British Journal of Pharmacology*, **160**, 833-835.
- Gerová, M. 1999. Acetylcholine and bradykinin induce paradoxically amplified hypotensive response in hypertensive NO-deficient rats. *Physiological Research*, **48**, 249-257.
- Gohla, A., Schultz, G. & Offermanns, S. 2000. Role for $\text{G}(12)/\text{G}(13)$ in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circulation Research*, **87**, 221-227.
- Gray, S. D. 1984. Pressure profiles in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Biology of the Neonate*, **45**, 25-32.
- Griffith, T. M. 2004. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *British Journal of Pharmacology*, **141**, 881-903.
- Guimaraes, S. & Moura, D. 2001. Vascular adrenoceptors: An update. *Pharmacological Reviews*, **53**, 319-356. Review
- Guyenet, P. G. 2006. The sympathetic control of blood pressure. *Nature Reviews Neuroscience*, **7**, 335-346. Review
- Hagen, C. H. L. 1839; cit. podle Sirs, J. 1991. The flow of human blood through capillary tubes. *Journal of Physiology*, **442**, 569-583. Review
- Hattori, T., Shimokawa, H., Higashi, M., Hiroki, J., Mukai, Y., Tsutsui, H., Kaibuchi, K. & Takeshita, A. 2004. Long-term inhibition of rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation*, **109**, 2234-2239.
- Head, R. J. 1989. Hypertensive innervation - its relationship to functional hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. *Blood Vessels*, **26**, 1-20.
- Hebert, S. C., Desir, G., Giebisch, G. & Wang, W. H. 2005. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiological Reviews*, **85**, 319-371. Review
- Hill, M. A. & Davis, M. J. 2007. Coupling a change in intraluminal pressure to vascular smooth muscle depolarization: still stretching for an explanation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **292**, H2570-H2572. Review
- Iizuka, K., Dobashi, K., Yoshii, A., Horie, T., Suzuki, H., Nakazawa, T. & Mori, M. 1997. Receptor-dependent G protein-mediated Ca^{2+} sensitization in canine airway smooth muscle. *Cell Calcium*, **22**, 21-30.
- Ikebe, M., Hartshorne, D. J. & Elzinga, M. 1987. Phosphorylation of the 20,000-Dalton light chain of smooth-muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein-kinase - phosphorylation sites and effects of phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 9569-9573.
- Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y. & Mori, Y. 2001. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular $\alpha(1)$ -adrenoceptor-activated Ca^{2+} -permeable cation channel. *Circulation Research*, **88**, 325-332.
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. & Narumiya, S. 1996. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO Journal*, **15**, 1885-1893.

- Ito, K., Hirooka, Y., Hori, N., Kimura, Y., Sagara, Y., Shimokawa, H., Takeshita, A. & Sunagawa, K. 2005. Inhibition of Rho-kinase in the nucleus tractus solitarius enhances glutamate sensitivity in rats. *Hypertension*, **46**, 360-365.
- Ito, K., Hirooka, Y., Sakai, K., Kishi, T., Kaibuchi, K., Shimokawa, H. & Takeshita, A. 2003. Rho/Rho-kinase pathway in brain stem contributes to blood pressure regulation via sympathetic nervous system - Possible involvement in neural mechanisms of hypertension. *Circulation Research*, **92**, 1337-1343.
- Itoh, T., Ikebe, M., Kargacin, G. J., Hartshorne, D.J., Kemp, B. E. & Fay, F.S. 1989. - Effects of modulators of myosin light-chain kinase activity in single smooth. *Nature*, **338**, 164-167.
- Izzard, A. S., Bund, S. J. & Heagerty, A. M. 1996. Myogenic tone in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **270**, H1-H6.
- Jackson, W. F. 2005. Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation*, **12**, 113-127. Review
- Judy, W. V., Watanabe, A. M., Henry, D. P., Besch, H. R., Murphy, W. R. & Hockel, G. M. 1976. Sympathetic-nerve activity - role in regulation of blood-pressure in spontaneously hypertensive rat. *Circulation Research*, **38**, 21-29.
- Kanagy, N. L. 2005. $\alpha(2)$ -adrenergic receptor signalling in hypertension. *Clinical Science*, **109**, 431-437.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J. H., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Kaibuchi, K. 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-Associated kinase (Rho-kinase). *Science*, **273**, 245-248.
- Kisters, K., Wessels, F., Kuper, H., Tokmak, F., Krefting, E. R., Gremmler, B., Kosch, M., Barenbrock, M. & Hausberg, M. 2004. Increased calcium and decreased magnesium concentrations and an increased calcium/magnesium ratio in spontaneously hypertensive rats versus Wistar-Kyoto rats: Relation to arteriosclerosis. *American Journal of Hypertension*, **17**, 59-62.
- Kitazawa, T., Masuo, M. & Somlyo, A. P. 1991. G-protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth-muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 9307-9310.
- Komatsu, S. & Hosoya, H. 1996. Phosphorylation by MAPKAP kinase 2 activates Mg^{2+} -ATPase activity of myosin II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **223**, 741-745.
- Korner, P. I. & Angus, J. A. 1992. Structural determinants of vascular-resistance properties in hypertension - hemodynamic and model analysis. *Journal of Vascular Research*, **29**, 293-312.
- Korner, P., Bobik, A., Oddie, C. & Friberg, P. 1993. Sympathoadrenal system is critical for structural-changes in genetic-hypertension. *Hypertension*, **22**, 243-252.
- Kumai, T., Takeba, Y., Matsumoto, N., Nakaya, S., Tsuzuki, Y., Yanagida, Y., Hayashi, M. & Kobayashi, S. 2007. Fasudil attenuates sympathetic nervous activity in the adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, **81**, 1193-1198.
- Kuneš, J., Hojná, S., Kadlecová, M., Dobešová, Z., Rauchová, H., Vokurková, M., Loukotová, J., Pecháňová, O. & Zicha, J. 2004. Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: The role of relative NO deficiency. *Physiological Research*, **53**, S23-S34.

- Lais, L. T., Rios, L. L., Boutelle, S., Dibona, G. F. & Brody, M. J. 1977. Arterial-pressure development in neonatal and young spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels*, **14**, 277-284.
- Langer, S. Z. 1974. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochemical Pharmacology*, **23**, 1793-1800.
- Laplace, P. S.; cit. podle Moriarty, T. F. 1980. Law of Laplace - its limitations as a relation for diastolic pressure, volume, or wall stress of the left-ventricle. *Circulation Research*, **46**, 321-331
- Laufs, U. & Liao, J. K. 1998. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by rho GTPase. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 24266-24271.
- Launay, P., Cheng, H., Srivatsan, S., Penner, R., Fleig, A. & Kinet, J. P. 2004. TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science*, **306**, 1374-1377.
- Leung, T., Manser, E., Tan, L. & Lim, L. 1995. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-Related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 29051-29054.
- Líšková, S. 2009, nepublikovaná data; cit. podle Pintérová, M., Líšková, S., Dobešová, Z., Behuliak, M., Kuneš, J. & Zicha, J. 2009. Impaired control of L-type voltage-dependent calcium channels in experimental hypertension. *Physiological Research*, **58**, S43-S54. Review
- Liu, Y. P., Pleyte, K., Knaus, H. G. & Rusch, N. J. 1997. Increased expression of Ca²⁺-sensitive K⁺ channels in aorta of hypertensive rats. *Hypertension*, **30**, 1403-1409.
- Lohn, M., Steioff, K., Bleich, M., Busch, A. E. & Ivashchenko, Y. 2005. Inhibition of Rho-kinase stimulates nitric oxide-independent vasorelaxation. *European Journal of Pharmacology*, **507**, 179-186.
- Loirand, G., Guerin, P. & Pacaud, P. 2006. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circulation Research*, **98**, 322-334. Review
- Loirand, G. & Pacaud, P. 2010. The role of rho protein signaling in hypertension. *Nature Reviews Cardiology*, **7**, 637-647. Review
- Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P. & Waldman, S. A. 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*, **52**, 375-413. Review
- Mackinnon, R. 1991. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*, **350**, 232-235.
- Sellers, K. W., Katovich, M. J., Gelband, C. H. & Raizada, M. K. 2001. Gene therapy to control hypertension: Current studies and future perspectives. *American Journal of the Medical Sciences*, **322**, 1-6.
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Kaibuchi, K. 1996. Rho-associated kinase, a novel serine threonine kinase, as a putative target for the small GTP binding protein Rho. *EMBO Journal*, **15**, 2208-2216.
- McCubbin, J. W., Green, J. H. & Page, I. H. 1956. Baroreceptor Function in chronic renal hypertension. *Circulation Research*.
- Mehta, D., Rahman, A. & Malik, A. B. 2001. Protein kinase C- α signals Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and Rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 22614-22620.

- Mukai, Y., Shimokawa, H., Matoba, T., Kandabashi, T., Satoh, S., Hiroki, J., Kaibuchi, K. & Takeshita, A. 2001. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic. *FASEB Journal*, **15**, 1062-4.
- Mulvany, M. J., Aalkjaer, C. & Christensen, J. 1980. Changes in noradrenaline sensitivity and morphology of arterial resistance vessels during development of high blood-pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **2**, 664-671.
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K. & Narumiya, S. 1996. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Letters*, **392**, 189-193.
- Nelson, M. T., Standen, N. B., Brayden, J. E. & Worley, J. F. 1988. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature*, **336**, 382-385.
- Nelson, P. L., Beck, A. & Cheng, H. 2011. Transient receptor proteins illuminated: Current views on TRPs and disease. *Veterinary Journal*, **187**, 153-164. Review
- Neppl, R. L., Lubomirov, L. T., Momotani, K., Pfitzer, G., Eto, M. & Somlyo, A. V. 2009. Thromboxane A(2)-induced bi-directional regulation of cerebral arterial tone. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 6348-6360.
- Neves, S. R., Ram, P. T. & Iyengar, R. 2002. G protein pathways. *Science*, **296**, 1636-1639. Review
- Nieves-Cintrón, M., Amberg, G. C., Nichols, C. B., Molkentin, J. D. & Santana, L. F. 2007. Activation of NFATc3 down-regulates the beta 1 subunit of large conductance, calcium-activated K⁺ channels in arterial smooth muscle and contributes to hypertension. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 3231-3240.
- Niirō, N. & Ikebe, M. 2001. Zipper-interacting protein kinase induces Ca²⁺-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 29567-29574.
- Northup, J. K., Sternweis, P. C., Smigel, M. D., Schleifer, L. S., Ross, E. M. & Gilman, A. G. 1980. Purification of the regulatory component of adenylate-cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, **77**, 6516-6520.
- Nunes, K. P., Rigsby, C. S. & Webb, R. C. 2010. RhoA/Rho-kinase and vascular diseases: what is the link? *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 3823-3836. Review
- Olofsson, B. 1999. Rho guanine dissociation inhibitors: Pivotal molecules in cellular signalling. *Cellular Signalling*, **11**, 545-554. Review
- Osborn, J. W. 2005. Hypothesis: Set-points and long-term control of arterial pressure. A theoretical argument for a long-term arterial pressure control system in the brain rather than the kidney. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **32**, 384-393.
- Paulis, L., Líšková, S., Pintérová, M., Dobešová, Z., Kuneš, J. & Zicha, J. 2007. Nifedipine-sensitive noradrenergic vasoconstriction is enhanced in spontaneously hypertensive rats: the influence of chronic captopril treatment. *Acta Physiologica*, **191**, 255-266.
- Phillips, M. I. & Kimura, B. 1988. Brain angiotensin in the developing spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension*, **6**, 607-612.
- Pintérová, M., Kuneš, J. & Zicha, J. 2011. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. *Physiological Research*, **60**, 381-402. Review
- Pintérová, M., Líšková, S., Dobešová, Z., Behuliak, M., Kuneš, J. & Zicha, J. 2009. Impaired control of L-type voltage-dependent calcium channels in experimental hypertension. *Physiological Research*, **58**, S43-S54. Review

- Poiseuille, J. L. M. 1846; cit. podle Sirs, J. 1991. The flow of human blood through capillary tubes. *Journal of Physiology*, **442**, 569-583.
- Pratt, P. F., Bonnet, S., Ludwig, L. M., Bonnet, P. & Rusch, N. J. 2002. Upregulation of L-type Ca^{2+} channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR. *Hypertension*, **40**, 214-219.
- Puetz, S., Lubomirov, L. T. & Pfitzer, G. 2009. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology*, **24**, 342-356. Review
- Rankinen, T., Church, T., Rice, T., Markward, N., Blair, S. N. & Bouchard, C. 2008. A major haplotype block at the Rho-associated kinase 2 locus is associated with a lower risk of hypertension in a recessive manner: The HYPGENE study. *Hypertension Research*, **31**, 1651-1657.
- Riobo, N. A. & Manning, D. R. 2005. Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G(12) family. *Trends in Pharmacological Sciences*, **26**, 146-154.
- Rusch, N. J. 2009. BK channels in cardiovascular disease: a complex story of channel dysregulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **297**, H1580-H1582. Review
- Rusch, N. J., Delucena, R. G., Wooldridge, T. A., England, S. K. & Cowley, A. W. 1992. A Ca^{2+} -dependent K^{+} current is enhanced in arterial membranes of hypertensive rats. *Hypertension*, **19**, 301-307.
- Rusch, N. J. & Runnells, A. M. 1994. Remission of high blood-pressure reverts arterial potassium channel alterations. *Hypertension*, **23**, 941-945.
- Sauzeau, V., Le Mellionec, E., Bertoglio, J., Scalbert, E., Pacaud, P. & Loirand, G. 2001. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circulation Research*, **88**, 1102-1104.
- Seasholtz, T. M., Majumdar, M., Kaplan, D. D. & Brown, J. H. 1999. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circulation Research*, **84**, 1186-1193
- Seasholtz, T. M., Wessel, J., Rao, F. W., Rana, B. K., Khandrika, S., Kennedy, B. P., Lillie, E. O., Ziegler, M. G., Smith, D. W., Schork, N. J., Brown, J. H. & O'Connor, D. T. 2006. Rho kinase polymorphism influences blood pressure and systemic vascular resistance in human twins - Role of heredity. *Hypertension*, **47**, 937-947.
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J. & Breard, J. 2001. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology*, **3**, 346-352.
- Shin, H. M., Je, H. D., Gallant, C., Tao, T. C., Hartshorne, D. J., Ito, M. & Morgan, K. G. 2002. Differential association and localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle. *Circulation Research*, **90**, 546-553.
- Simms, B. A. & Zamponi, G. W. 2012. Trafficking and stability of voltage-gated calcium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **69**, 843-856.
- Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. 1994. Signal-transduction and regulation in smooth-muscle. *Nature*, **372**, 231-236. Review
- Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. 2000. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *Journal of Physiology-London*, **522**, 177-185. Review
- Suizu, F., Ueda, K., Iwasaki, T., Murata-Hori, M. & Hosoya, H. 2000. Activation of actin-activated MgATPase activity of myosin II by phosphorylation with MAPK-activated protein kinase-1b (RSK-2). *Journal of Biochemistry*, **128**, 435-440.

- Suzuki, N., Hajicek, N. & Kozasa, T. 2009. Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *Neurosignals*, **17**, 55-70. Review
- Špinar, J., Vítovec, J. & Zicha, J. 1999. Hypertenze: diagnostika a léčba, Praha, Grada-Avicenum, 18.
- Takata, Y., Howes, L. G. & Hutchinson, J. S. 1983. Antihypertensive effects of diltiazem in young or adult-rats of genetically hypertensive strains. *Clinical and Experimental Hypertension Part a-Theory and Practice*, **5**, 455-468.
- Tamura, M., Nakao, H., Yoshizaki, H., Shiratsuchi, M., Shigyo, H., Yamada, H., Ozawa, T., Totsuka, J. & Hidaka, H. 2005. Development of specific Rho-kinase inhibitors and their clinical application. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, **1754**, 245-252.
- Theroux, T. L., Esbenshade, T. A., Peavy, R. D. & Minneman, K. P. 1996. Coupling efficiencies of human alpha(1)-adrenergic receptor subtypes: Titration of receptor density and responsiveness with inducible and repressible expression vectors. *Molecular Pharmacology*, **50**, 1376-1387.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. & Narumiya, S. 1997. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, **389**, 990-994.
- Wamhoff, B. R., Bowles, D. K. & Owens, G. K. 2006. Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle. *Circulation Research*, **98**, 868-878.
- Welsh, D. G., Morielli, A. D., Nelson, M. T. & Brayden, J. E. 2002. Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circulation Research*, **90**, 248-250.
- Westfall, T. C., Meldrum, M. J., Badino, L. & Earnhardt, J. T. 1984. Noradrenergic transmission in the isolated portal-vein of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, **6**, 267-274.
- Wirth, A. 2010. Rho kinase and hypertension. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, **1802**, 1276-1284. Review
- Wolfrum, S., Dendorfer, A., Rikitake, Y., Stalker, T. J., Gong, Y. L., Scalia, R., Dominiak, P. & Liao, J. K. 2004. Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **24**, 1842-1847.
- Yamaguchi, H., Kasa, M., Amano, M., Kaibuchi, K. & Hakoshima, T. 2006. Molecular mechanism for the regulation of Rho-kinase by dimerization and its inhibition by fasudil. *Structure*, **14**, 589-600.
- Yamawaki, K., Ito, M., Machida, H., Moriki, N., Okamoto, R., Isaka, N., Shimpō, H., Kohda, A., Okumura, K., Hartshorne, D. J. & Nakano, T. 2001. Identification of human CPI-17, an inhibitory phosphoprotein for myosin phosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **285**, 1040-1045.
- Yang, M., Ruan, J., Voller, M., Schalken, J. & Michel, M. C. 1999. Differential regulation of human alpha(1)-adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **359**, 439-446.
- Zarbis, N., Dosios, T., Sokolis, D. P., Papadimitriou, L., Dimitriou, C. A., Boudoulas, H. & Karayannacos, P. E. 2004. Effect of parasympathetic denervation on the mechanical properties of the aorta. *Proceedings of the Xxxix Congress of the European Society for Surgical Research*, 19-22.

- Zeidan, A., Nordstrom, I., Albinsson, S., Malmqvist, U., Sward, K. & Hellstrand, P. 2003. Stretch-induced contractile differentiation of vascular smooth muscle: sensitivity to actin polymerization inhibitors. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **284**, C1387-C1396.
- Zicha, J. & Kuneš, J. 1999. Ontogenetic aspects of hypertension development: Analysis in the rat. *Physiological Reviews*, **79**, 1227-1282. Review